

Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: **0 417 531 A1**

12

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 90116305.5

51 Int. Cl.<sup>5</sup>: **C12N 5/00, C12N 5/02,**  
//C12M3/00

22 Anmeldetag: 25.08.90

30 Priorität: 09.09.89 DE 3930140

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
20.03.91 Patentblatt 91/12

84 Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

71 Anmelder: **BAYER AG**

W-5090 Leverkusen 1 Bayerwerk(DE)

72 Erfinder: **Steiner, Ulrich, Dr.**

Krutscheider Weg 55

W-5600 Wuppertal 1(DE)

Erfinder: **Seifert, Horst, Prof. Dr.**

Heinrich-Deppe-Ring 28

W-3406 Bovenden 1(DE)

Erfinder: **Böhnel, Helge, Dr.**

Birkenweg 2a

W-3406 Bovenden 1(DE)

Erfinder: **Roth, Frauke, Dr.**

Kookweg 5

W-3403 Friedland(DE)

54 Verfahren zur Herstellung von biologischen Materialien in Zellkulturen und Vorrichtungen.

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von biologischen Materialien in Zellkulturen in einer kontinuierlichen Fermentationsweise und einer Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens. Das Verfahren erlaubt es, eine kontinuierliche Fermentation auch dann durchzuführen, wenn der herzustellende Wirkstoff erst nach einer geeigneten Induktion der Zellkultur freigesetzt wird, und auch wenn dies zu einer Zerstörung der induzierten Zellen führte. Unter Induktion wird verstanden die Behandlung mit einem chemischen Agens oder mit physikalischen Einflußgrößen oder die Infizierung der Zellen z.B. mit einem Virus, oder Kombinationen davon.

EP 0 417 531 A1

## VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BIOLOGISCHEN MATERIALIEN IN ZELLKULTUREN UND VORRICHTUNGEN

Bisher konnten biologische Materialien, wie Wirkstoff, Protein, Enzyme etc., die durch Induktion von Kulturen herzustellen sind, nur mit absatzweisen Produktionsverfahren hergestellt werden. Dies bedeutet, daß die Zellen in einem Kulturgefäß wie z.B. einem Fermenter angezogen werden und nach Erreichen eines bestimmten Zustandes die Induktion gesetzt wird. Nach einer vom Wirkstoff abhängigen Zeitspanne - in der Regel einige Tage - kann die Ernte erfolgen. Danach ist der Fermenter abzubereiten, zu reinigen und neu vorzubereiten für die nächste Fermentation. Bevor die nächste Induktion stattfinden kann, muß in einer Wachstumsphase erst wieder die Zellmasse aufgebaut werden. Der Nachteil dieses Verfahrens ist eine geringe Raum-Zeit-Ausbeute bedingt dadurch, daß der gesamte Zyklus Fermentervorbereitung, Wachstumsphase, Wirkphase der Induktion und Fermenterreinigung für jede einzelne Ernte erforderlich ist und daß nur geringe Zellkonzentrationen erreicht werden. Hinzu kommt, daß für große Produktmengen großvolumige Fermenter einzusetzen sind, so daß eine Kontamination den Verlust von großen Mengen an Nährlösung bewirkt.

Diese Nachteile bestehen nicht bei einem kontinuierlichen Produktionsverfahren. Nach der einmaligen Fermentervorbereitung und Wachstumsphase kann der Fermentationsprozeß langfristig ohne Unterbrechung laufen und es wird eine wesentlich höhere Zellkonzentration erreicht. Dadurch steigt die Raum-Zeit-Ausbeute was die Reduktion der Volumen der Fermentergefäße erlaubt. Entsprechend sinken die Materialverluste im Falle einer Kontamination. Solche Verfahren wurden bisher erfolgreich eingesetzt für die Herstellung von Wirkstoffen aus Zellkulturen, wobei die Zellen den Wirkstoff oder Vorstufen davon synthetisieren und in die Nährlösung abgeben, ohne daß eine Induktion erforderlich ist. Beispiele sind Zellkulturen von Bowes Melanoma Zellen (Produkt: Tissue Plasminogen Activator), Hybridoma Zellen (Produkt: Monoklonale Antikörper) oder Zellen mit neukombinierter Nukleinsäure (Produkt: z.B. Faktor VIII). Ein weiterer Vorteil der kontinuierlichen Kultur ist die bessere Qualität des Produktes, da sich hier im Gegensatz zur absatzweisen Produktion konstante Kulturbedingungen einstellen lassen z.B. bezüglich Zelldichte, Konzentration der Nährstoffe und Konzentration von Abbauprodukten und unerwünschten Beiprodukten wie Proteasen. Wegen der geringeren Verweilzeit des Produktes in der Nährlösung ist zudem auch der Abbau des Produktes durch z.B. Proteasen oder anderen chemischen Wechselwirkungen in der Nährlösung reduziert.

Mit dem Verfahren der Erfindung wird eine kontinuierliche Produktion nun auch bei Produktionsverfahren möglich, die eine Induktion der Kultur erfordern.

Unterschiedliche Arten der Induktion lassen sich mit der Erfindung realisieren:

### 1. Induktion durch Infektion mit einem anderen Organismus

Beispiel für einen anderen Organismus sind Viren. Zur Herstellung von Virus und viralem Antigen wird die Induktion der Kultur durchgeführt durch Infektion mit dem Virus. Statt eines natürlichen Virus kann auch ein Virus verwendet werden, der mit Hilfe von gentechnischen Methoden so verändert wurde, daß die infizierten Zellen ein rekombinantes Protein exprimieren. Von besonderem Interesse sind hier Kulturen von Insektenzellen und ein Virusexpressionssystem wie z.B. das Baculovirus-Expressionssystem. Diese Expressionssysteme zeichnen sich dadurch aus, daß die Viren nicht infektiös sind für Menschen und somit eine große Sicherheit bei der Anwendung von in diesen Systemen exprimierten rekombinanten Proteinen am Menschen besteht. Außerdem ist gezeigt worden, daß mit diesen Systemen hohe Produktkonzentrationen in der Nährlösung erreicht werden können, was sich sowohl auf die Ökonomie wie auch - wegen der einfacheren Reinigung bei höheren Konzentrationen - auf die Produktqualität positiv auswirkt. Bisher sind jedoch nur absatzweise Produktionsverfahren eingesetzt worden, die die oben beschriebenen Nachteile haben.

### 2. Induktion durch vorübergehende oder permanente Veränderung der chemischen Bedingungen

Hier wird die Induktion erzielt, indem das chemische Milieu, in dem sich die Zellen befinden, geändert wird. In der Regel wird diese Veränderung durch Zugabe von Substanzen erreicht. Beispiel für einen solchen Prozeß ist die Produktion von Lymphokinen wie IL-2 mit tierischen Zellkulturen. Hier wird die Induktion erreicht, indem Phorbol ester der Nährlösung zugegeben wird.

Eine vorübergehende Änderung läßt sich erzielen, wenn die Milieuänderung rückgängig gemacht werden kann, z.B. in dem die zugegebenen Substanzen durch Fällung oder Inaktivierung oder Abzug z.B. über Membransysteme entfernt werden.

5

### 3. Induktion durch vorübergehende oder permanente Veränderung der physikalischen Bedingungen

Verändert werden können die physikochemischen Bedingungen der Nährlösung wie z.B. pH,  $pO_2$  Redoxpotential, Viskosität als auch physikalische Bedingungen wie Temperatur, Einwirkung von Licht und  
 10 anderer Strahlung, Einwirkung von elektrischen Strömen und Magnetfeldern, und anderes mehr. Als Beispiel sei die Herstellung von Heat-Shock-Proteinen genannt, wofür die Zellen vorübergehend einer höheren Temperatur ausgesetzt werden.

### 15 Beschreibung des Verfahrens

Die Aufgabe der Erfindung, eine kontinuierliche Kultur in Prozessen, die eine Induktion erfordern, zu ermöglichen, wurde wie folgt gelöst:

A) Wenn die Induktion dauerhaft bestehen darf oder muß:

20 In einem Bioreaktor A werden Zellen in Suspension in einem Nährmedium kultiviert. Nach Erreichen einer bestimmten Zelldichte in Bioreaktor A wird begonnen, die Suspension in einen zweiten Bioreaktor B kontinuierlich überzuleiten und gleichzeitig frisches Nährmedium in den Bioreaktor A so einzuleiten, daß dessen Füllvolumen im zeitlichen Mittel konstant bleibt. Die Zelldichte und Wachstumsrate der Zellen im Bioreaktor A kann eingestellt werden durch den Volumenstrom, mit dem Suspension von Bioreaktor A nach  
 25 Bioreaktor B überführt wird. Die Zellen werden in dem Bioreaktor B induziert. Zur Optimierung der Wachstums- und Produktbildungsbedingungen kann ein Erhaltungsmedium zusätzlich in den Bioreaktor B kontinuierlich zugegeben werden. Der Inhalt des Bioreaktors B, der aus der verbrauchten Nährlösung, den restlichen Zellen, den Zellfragmenten, dem Induktor und weiteren Stoffen besteht, wird kontinuierlich geerntet. Die mittlere Verweilzeit in dem Bioreaktor B muß im Hinblick auf optimale Produktqualität und  
 30 Produktausbeute experimentell bestimmt werden. Für Induktoren, die zu einer Lyse der Zellen führen, mag dies z.B. der Zustand sein, bei dem 80 % der Zellen lysiert sind. Die Verweilzeit kann durch Wahl des Volumens des Bioreaktors B eingestellt werden.

B) Wenn die Induktion nur vorübergehend sein soll:

Die Induktion sollte dann nicht im Bioreaktor B stattfinden, sondern in der Transferleitung, die von  
 35 Bioreaktor A nach Bioreaktor B führt, vorgenommen werden und bei Eintritt der Zellen in den Bioreaktor B abgeschlossen sein. Die Dauer der vorübergehenden Induktion kann gesteuert werden durch die Verweilzeit in der Transferleitung, die durch geeignete Versuche ermittelt werden kann und die durch Länge und Form der Leitung sowie durch den Volumenstrom eingestellt werden kann. Ansonsten entspricht das Verfahren dem wie für eine dauerhafte Induktion beschriebenen.

40 Die Aufreinigung der aus dem Bioreaktor B kontinuierlich entnommenen Ernten erfolgt entweder kontinuierlich oder - nach Sammlung in einem Sammelgefäß - absatzweise. Es werden bekannte Trennverfahren eingesetzt, wie Trennung über Membranen verschiedener Porengröße, Zentrifugen, Säulentrennverfahren u.a. Die Reinigungsprozedur hängt ab von den eingesetzten Zellkulturen und Nährlösungen, den Induktionen, dem Produkt und den Anforderungen an die Reinheit des Produktes. Die Reinigungsprozedur  
 45 ist unter Umständen für jedes Produkt neu zu bestimmen.

Die Meß- und Regeltechnik für die Bioreaktoren und Pumpen wird nach dem Stand der Technik ausgelegt. Vorzugsweise wird die Steuerung der Gesamtanlage durch einen übergeordneten Leitreechner vorgenommen jedoch können auch individuelle Regler eingesetzt werden.

Die Steuerung der Pumpraten für den Transfer von Nährlösung und Zellsuspension zwischen den  
 50 Vorrats-, Fermenter- und Erntegefäßen erfolgt vorzugsweise durch photometrische Bestimmung der Zelldichte bzw. des Ausmaßes der Lyse der Zellkultur.

Die Begasung der Bioreaktoren kann erfolgen durch direktes Einblasen z.B. von Luft,  $O_2$ ,  $N_2$  oder  $CO_2$  in die Flüssigkeit oder indirekt durch Ausnutzung der Diffusion über die Oberfläche der Flüssigkeit oder durch Membranen (Hohlfasermembranen oder Silikonschlauchmembranen), die in die Flüssigkeit der  
 55 Bioreaktoren eintauchen oder in einer externen Schleife eingebaut sind.

Zur Vermeidung von Kontaminationen vorgeschalteter Systeme durch Inhaltsstoffe der Folgesysteme werden vorzugsweise alle Verbindungen zwischen den Systemen mit Rückwuchsfallen ausgestattet.

Die Figur 1) zeigt eine erfindungsgemäß bevorzugte Vorrichtung mit einem Bioreaktor A 2, in den

gesteuert aus Nährmediumvorratsbehältern 4 über eine Leitung 6, die mit einer Pumpe 8 ausgerüstet ist, Nährmedium in den Bioreaktor A 2 eingeführt wird.

Der Bioreaktor A 2 ist hier weiter mit Hohlfasermembranen 58 ausgerüstet, über die Gase zur Regulierung des pH oder  $pO_2$  eingeleitet werden können. Zusätzlich ist der Bioreaktor A 2 mit einem Magnetrührer 62 und über eine Leitung 66, die ein Überdruckventil aufweist, mit dem Abluftsicherheitsgefäß 70 verbunden; wobei die Leitung einen Hohlfaserfilter 82 zum Zurückhalten eventuell vorhandener Viren aufweist. Der Bioreaktor A 2 ist über eine Leitung 10, die mit einem Photometer 12 und einer Rückwuchsfalle ausgerüstet ist, mit dem Bioreaktor B 14 verbunden, in den über eine Leitung 18, die mit einer Pumpe 20 und einer Rückwuchsfalle ausgerüstet ist, aus den Behältern für Erhaltungsmedium 16 Medium zum Bioreaktor B 14 zugeführt wird. Weiter ist der Bioreaktor B 14 mit einer Hohlfasermembran 60 ausgerüstet, die zur Begasung und mit zur Regulierung des pH und  $pO_2$  dient. Zusätzlich weist der Bioreaktor B 14 einen Magnetrührer 64 zum Vermischen der Inhaltsstoffe auf. Eine Leitung 68 mit einem Überdruckventil dient zum Druckausgleich und führt in das Abluftsicherheitsgefäß 70 über einen Hohlfaserfilter 84, in dem eventuell vorhandene Viren zurückgehalten werden. Der Bioreaktor B 14 ist mit dem ersten Retentatbehälter 26 der ersten Filtrationsanordnung über eine Leitung 22, die mit einem Photometer 24 und einer Rückwuchsfalle ausgerüstet ist, verbunden, der wiederum über eine Leitung 78 mit einem daran vorhandenen Hohlfaserfilter 86 mit dem Abluftsicherheitsgefäß 70 zum Druckausgleich verbunden ist. Retentat aus dem ersten Retentatbehälter 26 wird über die Leitung 36, die mit einer Rückwuchsfalle ausgerüstet ist, abgezogen. Aus dem ersten Retentatbehälter 26 wird über eine Leitung 28, die mit einem Photometer 30 ausgerüstet ist, Suspension in den ersten Filter 32 geleitet, und daraus das Retentat über die Leitung 34 in den ersten Retentatbehälter 26 zurückgeführt und das Filtrat über die Leitung 38, die mit einer Rückwuchsfalle ausgerüstet ist, in den zweiten Retentatbehälter 40 eingeleitet, der wiederum mit einer Druckausgleichsleitung 80 versehen ist, die über einen Hohlfaserfilter 86 in das Abluftsicherheitsgefäß 70 mündet. Weiter ist der zweite Retentatbehälter 40 mit einer Leitung 50 versehen, die eine Rückwuchsfalle enthält und über die Viruskonzentrat abgezogen wird. Aus dem zweiten Retentatbehälter 40 wird über eine Leitung 42, die mit einer Pumpe 44 versehen ist, Suspension in die Filtrationsvorrichtung 46 geführt, deren Retentat über die Leitung 48 in den zweiten Retentatbehälter 40 zurückgeführt wird, und deren Filtrat über die Leitung 54, die mit einer Rückflußfalle ausgestattet ist, abgezogen wird. Aus den Waschflüssigkeitsbehältern 76 kann ebenfalls rechnergesteuert über Leitungen 72, die mit Rückflußfallen ausgestattet sind und mit einer Pumpe 74 versehen sind, Waschflüssigkeit in die Retentatbehälter 26, 40 zugeleitet werden.

Die Steuerung der Zu- und Ableitungen zu und aus den verschiedenen Teilen der Vorrichtung wird mit Hilfe eines Prozeßrechners 56 durchgeführt.

Das folgende Beispiel soll die Erfindung weiter erläutern.

35

#### Beispiel 1

Herstellung von BHK 21 Klon 13 Zellen in kontinuierlicher Suspensionskultur.

Die Anzucht der Zellen BHK 21 Klon 13 (ECACC Nr. 84100501 (zu beziehen durch Flow Laboratories Meckenheim)) kann sowohl in Monolayer- als auch in Rollerflaschen erfolgen. Zur Inokulation müssen im Fermenter mindestens  $8 \times 10^4$  Zellen pro ml vorhanden sein, um ein schnelles Anwachsen der Kultur zu gewährleisten. Die Verdopplungszeit der BHK 21 Klon 13 Zellen betrug 24 Stunden. Mit der kontinuierlichen Zellgewinnung konnte nach 3 Tagen begonnen werden, sobald die Zellzahl mindestens  $4 \times 10^5$  pro ml betrug. Die Mediumzugabe (9,538 g/l MEM (minimal ess. media) mit Earls Spinnersalzen, 2,2 g/l  $NaHCO_3$ , 10,0 ml/l MEM-Vitaminlösung, 10,0 ml/l nicht essentielle Aminosäuren, 10,0 %/l foetales Kälberserum, über Hohlfaserbündel, die direkt an den Bioreaktor angeschlossen sind, steril filtriert) betrug zum Fermentationsbeginn 240 ml pro Tag, das entspricht einer Verdünnung von 1:12,5 und konnte proportional zum Wachstum bis 1500 ml pro Tag gesteigert werden (1:2). Die Regulierung erfolgte über ein eingebautes Photometer. Die Zellen wuchsen ohne Mikrocarrier. Das Reaktionsvolumen des Bioreaktors A betrug 4 l, das Flüssigkeitsvolumen 3 l. Die Reaktionstemperatur war  $37^\circ C$ , die Rührgeschwindigkeit 150 U/min, der pH-Wert wurde auf 7,0 und der  $pO_2$  auf 45 %  $O_2$  einer luftkalibrierten Lösung eingestellt. Der Gasgrundstrom betrug hierbei 4,5 l/min. Als Vordruck wurden 40 mbar  $N_2$ , 20 mbar  $O_2$  und 30 mbar  $CO_2$  sowie Luft ohne Regelung eingesetzt. Als Geräte wurden im Beispiel die Folgenden eingesetzt:

55

## Hersteller:

5	Mediumzugab :	Pump IV	BCC
			R. Wissel Str. 11
			D-3400 Göttingen
		Pumpe III	BCC
10	Temperaturregelung:	Modul TEM	BCC
	Temperaturfühler:	PT 100	Schraer
15			Postfach 747
			D-4920 Lemgo 1
	Externes Heizgerät:	Kälte-Umwälz-	Haake
		Bad-Thermostat	Dieselstr. 4
20		KT 2	D-7500 Karlsruhe 41
		Typ 001-3973	
	Internes Heizgerät:	Temperierkorb	BCC/IBT
25		eigene Entwick-	IBT e.V.
		lung	Kellnerweg 6
			D-3400 Göttingen
30	Rührung:	Modul SPE	BCC
	Interner Antrieb:	im Gefäßdeckel	
		fest verankert	
		Magnetrührstab	
35		mit aufgesetzten	
		Rührpropellern	

40

45

50

55



(Fortsetzung)

Hersteller:

5

Externer Antrieb: im Versorgungsgehäuse  
fest installierter  
Magnetrührer

10

pH-Regulierung:	Modul PH	BCC
Elektrode:	pH-Elektrode	Ingold
	autoklavierbar	Siemensstr. 9
	pH-Bereich 0-12	D-6374 Steinbach
	Typ 465-36-90-K9	

15

pO <sub>2</sub> -regulierung:	Modul PO <sub>2</sub>	BCC
-------------------------------	-----------------------	-----

20

Elektrode:	pO <sub>2</sub> -Elektrode	Ingold
	autoklavierbar	
	Typ 7455 / 322756702	

25

Gasversorgung:

30

Version I:	-Durchflußregelventile	
	Meßrohr FD-I/8-08-G-5/m	Fischer & Porter
		Drensfelder Str.2
		D-3400 Göttingen

35

	-Magnetventile	BCC
	Oliven 5 mm ø	
	-Gasmischgefäß	BCC

40

Version II:	-Massendurchflußregler	MKS
		Schatzbogen 43
		D-8000 München 82
	-Gasmischgefäß	BCC

45

50

55

(Fortsetzung)

Hersteller:

5

Druckminderer:

Typ Nr. D 142/O<sub>3</sub>

Drägerwerk AG

Preßluft:

kontinuierlicher

Moislinger

Luftstrom

Allee 53/55

10

D-2400 Lübeck 1

Hohlfaser

zur Belüftung:

Accurel (R) PP

Enka-Membrana

15

ENKA AKZO AG

Öhderstr. 28

D-5600 Wuppertal 2

20

Typ S 6/2 hydrophob Akzo

Porengröße:

max. 0,54 µm

Wicklung:

senkrecht zum Flüssig-  
keitsspiegel

25

Bedarf:

3 m/l 1 Flüssigkeit

Niveauregulierung: Modul NIV

BCC

30

Elektroden:

autoklavierbar

BCC

Teflonüberzug

Dichtebestimmung

der Zell-Sus-

35

pension:

Durchflußphotometer

Monitec GmbH

Mörsenbroi-

cher Weg 200

40

D-4000 Düssel-

dorf 30

45

Beispiel 2

Kontinuierliche Produktion von ND (Newcastle Disease) Vakzine auf BHK 21 Zellen  
Als Zellerhaltungsmedium wurde folgendes Medium verwendet:

50

55

MEM (minimal ess. media) mit Earl's Spinnersalzen	9,543 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	2,2 g/l
MEM-Vitaminlösung	10,0 ml/l
fötales Kälberserum	2,0 %/l

Sterilisation des Mediums erfolgt durch Filtration über direkt an den Bioreaktor angeschlossene Hohlfaserbündel.

#### 5 Virusinoculum für den Bioreaktor B (Virus)

Der Virusfermenter wurde mit einer auf BHK Monolayer gezüchteten Kultur, die in 100 ml  $7,1 \times 10^7$  ID Virus enthält, beimpft. Die Infektion der Monolayerkultur war zwei Tage vor der ersten Frischzellenzugabe in den Bioreaktor erfolgt. Der Zellrasen der Monolayerkultur durfte bis zu diesem Zeitpunkt der Beimpfung des Virusfermenters noch keine Zellysis aufweisen. Die eigentliche Freisetzung der Viren sollte im Fermenter erfolgen und zwar zum Zeitpunkt der Zellzugabe aus dem Zellreaktor (Reaktor A).

Zur Inokulation aus Bioreaktor A wurden  $6 \times 10^6$  Zellen/ml in einer Durchflußmenge von 50 bis 100 ml pro Stunde (je nach Zellwachstum) von Bioreaktor A zu Reaktor B bei  $3,0 \times 10^8$  bis  $6,0 \times 10^8$  Zellen pro Stunde in Reaktor B zugegeben. Das Reaktorvolumen des Bioreaktor B war ebenfalls 4 l, das Flüssigkeitsvolumen 3 l, die Temperatur  $37^\circ \text{C}$ , die Rührgeschwindigkeit 150 Umdrehungen pro Minute, der pH-Wert wurde auf 7,0, der  $\text{pO}_2$ -Wert auf 40,0 %  $\text{O}_2$  in einer luftkalibrierten Lösung eingestellt. Der Gasgrundstrom betrug 4,0 l pro Minute, als Vordruck wurde 40 mbar  $\text{N}_2$ , 20 mbar  $\text{O}_2$ , 30 mbar  $\text{CO}_2$  und Luft ohne Regelung des Vordrucks eingesetzt. Die Mediumzugabe betrug 2 l pro Tag und die Zellzugabe durchschnittlich  $1,2 \times 10^{10}$  Zellen pro Tag. Die Virusernte ergab  $1,0 \times 10^7$  ID/ml =  $2,0 \times 10^{10}$  ID/Tag, wobei die Ernte erfolgte, wenn 80 % der Zellen zerstört waren. Die Geräteausstattung des Bioreaktors 2 entsprach der des Bioreaktors I, jedoch mit folgenden Besonderheiten:

#### Regulierung der Mediumzugabe in Verbindung mit dem Zellzulauf aus dem Reaktor I

Die im Reaktor I eingebaute Niveauregulierung öffnete zeitverzögert zwei Magnetventile:  
Magnetventil 1: Zellfluß zu Reaktor II wurde ermöglicht  
Magnetventil 2: Magnetventil 1 war geschlossen; zum Freispülen der Zuleitung von Zellen wurde der Mediumzulauf für Reaktor II geöffnet;  
Öffnungszeit 5 bis 10 Sekunden

Abluftentsorgung:		
		Firmen
Fritte:	0,4 $\mu\text{m}$ Porengröße	BCC
NaOH-Bad:	2 %iges Laugenbad	
Filter:	Schwebstoffklasse S	Enka
	Porengröße 0,05 $\mu\text{m}$	Akzo
	hydrophob	
Bestimmung des cytopathischen Effektes zur Ermittlung des Virustiters:	Durchfluß-Photometer	BCC

Die Abscheidung von Zellresten erfolgte über Zellfilter mit 0,45  $\mu\text{m}$  Porengröße (Akzo MD 020 P2N) in der Filtrationsanordnung 1 und über Virusfilter 50.000 NMGG (Akzo V 100 I) in der Filtrationsanordnung 2. Zahnradpumpen, Niveauregulierung und Magnetventile stammten von der Firma BCC. Als übergeordnete Koordination der Bioreaktoren und Filter wurde der industrielle Leitrechner FLS1 mit angepaßter Software der Firma Münzer und Diehl verwendet. Das Leitrechnersystem kontrollierte durch Dichtebestimmung das Zellwachstum im Bioreaktor A und die Virusvermehrung über den cytopathischen (lytischen) Effekt in Bioreaktor B und steuert den Nährboden-zulauf zu Bioreaktor A und Zellabgabe von Bioreaktor B optimal. Die variabel drehenden Pumpen des Filtrationssystems wurden über den Rechner so gesteuert, daß alles anfallende Material sofort aufgearbeitet wurde.

#### Ansprüche



1. Kontinuierliches Verfahren zur Herstellung biologischer Materialien die nach Induktion von Zellkulturen herzustellen sind, dadurch gekennzeichnet, daß in einem ersten Bioreaktor eine Vorkultur erfolgt, das dann die Zellen in einem zweiten Bioreaktor kontinuierlich überführt werden und das bei oder nach der Überführung in den zweiten Bioreaktor die Induktion gesetzt wird, die zur Produktion des biologischen  
5 Materials führt.

2. Verfahren nach Anspruch 1 wobei die Induktion durch einen Virus, durch chemische oder durch physikalische Veränderungen erfolgt.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

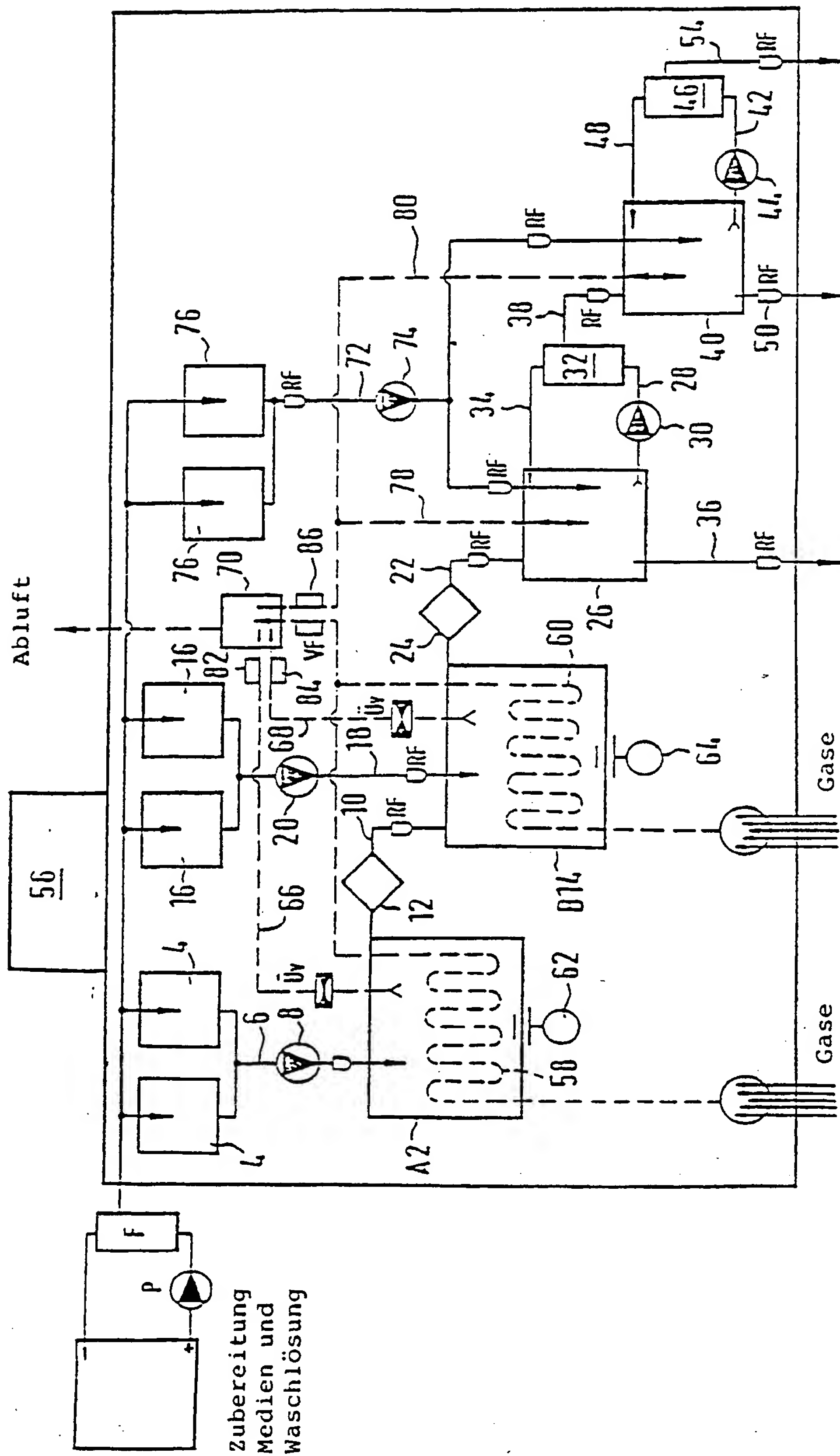


FIG.1



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 90116305.5

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.)
A	AT - B - 374 828 (DR. KARL THOMAE GMBH) * Anspruch; Beispiel 1 * --	1, 2	C 12 N 5/00 C 12 N 5/02 //C 12 M 3/00
A	AT - B - 370 132 (DR. KARL THOMAE GMBH) * Anspruch 1 * --	1, 2	
A	AT - B - 362 334 (THE WELLCOME FOUNDATION LTD.) * Anspruch 1; Beispiele 1, 2 * --	1, 2	
A	EP - A1 - 0 301 833 (MITSUI PETROCHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) * Zusammenfassung * ----	1	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.)
			C 12 N C 12 M C 12 P
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort WIEN		Abschlußdatum der Recherche 06-11-1990	Prüfer WOLF
<div><div>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</div><div>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</div><div>E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument  &amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</div></div>			

EPA Form 1503 03 82

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**